

植

# 植物组织培养

培

潘瑞焯 主编

ZHI WU ZU ZHI PEI YANG

植



广东高等教育出版社

# 植物组织培养

主编 潘瑞炽  
编者 施和平  
李玲  
王小菁

广东高等教育出版社  
·广州·

图书在版编目 (CIP) 数据

植物组织培养/潘瑞炽主编. —广州: 广东高等教育出版社,  
2000. 8

ISBN 7-5361-2501-1

I. 植… II. 潘… III. 植物-组织培养 IV. Q943.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 28820 号

广东高等教育出版社出版发行

广州市新明光印刷有限公司印刷

2000 年 8 月第 1 版 2000 年 8 月第 1 次印刷

开本: 850×1168 毫米 1/32 印张: 4 字数: 100 千字

印数: 1~3000 册

定价: 8.00 元

# 前 言

植物生物技术是当前世界新技术革命的一个组成部分，而植物组织培养则是生物工程技术中的基本研究手段。近 20 多年来，我国植物组织培养在全国各地广泛开展，在农业和林业上取得了巨大成就，例如，花药培养和单倍体育种、无性系快速繁殖、突变体筛选培育、药用植物工厂化生产、种质保存和基因库建立等。植物组织培养技术不仅在生产上起作用，它对于细胞学、遗传学、生理学和生物化学等研究也是一个十分有力的手段，促进生物学基础学科的发展。因此，无论在生产应用上或理论研究上，植物组织培养都是十分重要的。

基于植物组织培养的重要性，我国农林院校和生物类专业大多开设植物组织培养课程或把这些内容并入另一实验课内；作为第二课堂，一些中学也开展植物组织培养活动；一些农业科研单位也进行植物组织培养工作。因此，植物组织培养工作遍及全国各地。

目前，市面上有一些关于植物组织培养技术的书籍，但有的侧重于具体作物，有的侧重于专题讨论。编者根据多年来的教学实践，在原有教学提纲的基础上，参考一些资料，编写了这个教材，叙述植物组织培养的基本理论和基本操作。本书可作为大专院校植物组织培养课教材，也可作为农业科研人员的参考书。

本书绪论和第七章由潘瑞炽执笔，第一、二、三、四章由施

和平执笔，第五、六、八、九章由李玲执笔，第十、十一章由王小菁执笔。全书最后由潘瑞炽统稿。

由于编者水平有限，时间仓促，书中不当及错误之处，恳请读者批评指正。

编者  
2000年4月

# 目 录

绪论 .....	( 1 )
一、植物细胞的全能性 .....	( 1 )
二、植物组织培养的历史 .....	( 1 )
三、植物组织培养的应用 .....	( 3 )
<b>第一章 实验室设备和一般技术 .....</b>	<b>( 5 )</b>
<b>第一节 实验室设计和常用设备 .....</b>	<b>( 5 )</b>
一、实验室设计 .....	( 5 )
二、常用设备和器材 .....	( 8 )
<b>第二节 玻璃器皿的选择与清洗 .....</b>	<b>( 13 )</b>
一、玻璃器皿的选择 .....	( 13 )
二、玻璃器皿的清洗 .....	( 15 )
<b>第二章 培养基及其配制 .....</b>	<b>( 17 )</b>
<b>第一节 培养基的成分 .....</b>	<b>( 17 )</b>
一、无机营养物 (无机盐) .....	( 17 )
二、碳源和能源 .....	( 18 )
三、维生素类 .....	( 19 )
四、氨基酸及有机附加物 .....	( 19 )
五、植物长生调节物质 .....	( 20 )
六、琼脂 .....	( 21 )
七、活性炭 .....	( 21 )
八、pH值 .....	( 22 )
<b>第二节 培养基的配制 .....</b>	<b>( 22 )</b>
一、水和药品 .....	( 22 )

二、母液的配制 .....	(23)
三、培养基配制程序 .....	(25)
第三节 常用培养基的配方及其特点 .....	(27)
一、几种常用培养基的配方 .....	(27)
二、几种常用培养基的特点 .....	(31)
<b>第三章 外植体的选择和灭菌 .....</b>	<b>(33)</b>
第一节 外植体的选择 .....	(33)
一、外植体部位 .....	(33)
二、取材季节 .....	(34)
三、器官的生理状态和发育年龄 .....	(35)
四、外植体大小 .....	(35)
第二节 外植体的灭菌方法 .....	(36)
一、常用灭菌药剂 .....	(36)
二、外植体灭菌方法 .....	(38)
三、不同灭菌剂的效果差异 .....	(39)
第三节 污染原因和预防措施 .....	(39)
一、培养物污染的原因 .....	(39)
二、污染的预防措施 .....	(40)
<b>第四章 外植体的接种和培养 .....</b>	<b>(41)</b>
第一节 外植体的接种 .....	(41)
一、接种室的消毒 .....	(41)
二、外植体的接种 .....	(41)
第二节 培养条件 .....	(42)
一、温度 .....	(42)
二、光照 .....	(44)
三、培养基的 pH 值 .....	(45)
四、湿度 .....	(45)
五、氧和其他气体 .....	(46)

第三节	外植体褐变及其防止 .....	(46)
一、	褐变的原因 .....	(46)
二、	褐变的预防措施 .....	(47)
第四节	培养物的玻璃化现象及其预防措施 .....	(48)
一、	培养物的玻璃化现象及其产生原因 .....	(48)
二、	培养物玻璃化的预防措施 .....	(50)
<b>第五章</b>	<b>愈伤组织的培养 .....</b>	<b>(52)</b>
第一节	愈伤组织的诱导和分化 .....	(52)
一、	愈伤组织的诱导 .....	(52)
二、	愈伤组织细胞的分化 .....	(53)
第二节	愈伤组织培养中的形态发生 .....	(56)
一、	不定芽和根的形成 .....	(56)
二、	体细胞胚胎发生 .....	(56)
<b>第六章</b>	<b>器官培养 .....</b>	<b>(60)</b>
第一节	根的培养 .....	(60)
一、	培养过程 .....	(60)
二、	培养基 .....	(60)
第二节	茎的培养 .....	(62)
一、	茎段培养过程 .....	(63)
二、	培养基 .....	(63)
第三节	叶的培养 .....	(64)
一、	培养过程 .....	(64)
二、	培养基 .....	(65)
<b>第七章</b>	<b>快速繁殖中的脱毒 .....</b>	<b>(67)</b>
第一节	茎尖培养脱毒 .....	(68)
一、	病毒在植物体内的分布 .....	(68)
二、	无病毒苗的获得 .....	(69)
第二节	其他途径脱毒 .....	(72)



一、愈伤组织脱毒 .....	(72)
二、珠心胚培养脱毒 .....	(73)
三、茎尖微体嫁接脱毒 .....	(73)
第三节 脱毒苗的鉴定 .....	(73)
一、直接测定法 .....	(74)
二、指示植物法 .....	(74)
三、抗血清鉴定法 .....	(75)
四、电子显微镜检查法 .....	(75)
第四节 脱毒后防病毒再感染 .....	(75)
一、无病毒苗的隔离保存 .....	(75)
二、无病毒苗的长期保存 .....	(76)
<b>第八章 花药和花粉培养 .....</b>	<b>(77)</b>
第一节 花药培养技术 .....	(77)
一、培养方法 .....	(77)
二、培养基 .....	(79)
三、花粉发育时期 .....	(80)
四、花粉植株的诱导途径 .....	(81)
第二节 单倍体植株二倍化 .....	(82)
<b>第九章 细胞培养 .....</b>	<b>(84)</b>
第一节 单细胞的分离 .....	(84)
一、单细胞的分离方法 .....	(84)
二、从愈伤组织分离单细胞 .....	(84)
第二节 细胞悬浮培养 .....	(85)
一、培养类型 .....	(85)
二、悬浮培养条件 .....	(87)
第三节 单细胞培养 .....	(88)
一、单细胞培养技术 .....	(88)
二、影响单细胞培养的因素 .....	(91)

<b>第十章 原生质体培养和体细胞杂交</b> .....	(93)
<b>第一节 原生质体培养</b> .....	(93)
一、设备与用具 .....	(93)
二、化学试剂 .....	(94)
三、酶类 .....	(95)
四、原生质体的分离与纯化 .....	(95)
五、原生质体培养 .....	(98)
<b>第二节 原生质体融合</b> .....	(100)
一、细胞融合的方法 .....	(101)
二、细胞融合的程序 .....	(102)
<b>第十一章 种质保存</b> .....	(106)
<b>第一节 低温保存</b> .....	(106)
<b>第二节 超低温保存</b> .....	(107)
一、冰冻保护剂 .....	(108)
二、保存液 .....	(108)
三、材料的预备和预处理 .....	(109)
四、超低温保存操作 .....	(109)
<b>附录</b> .....	(112)
一、植物生长调节物质溶液的配制 .....	(112)
二、摩尔浓度和 ppm 浓度的换算 .....	(114)
<b>主要参考文献</b> .....	(117)

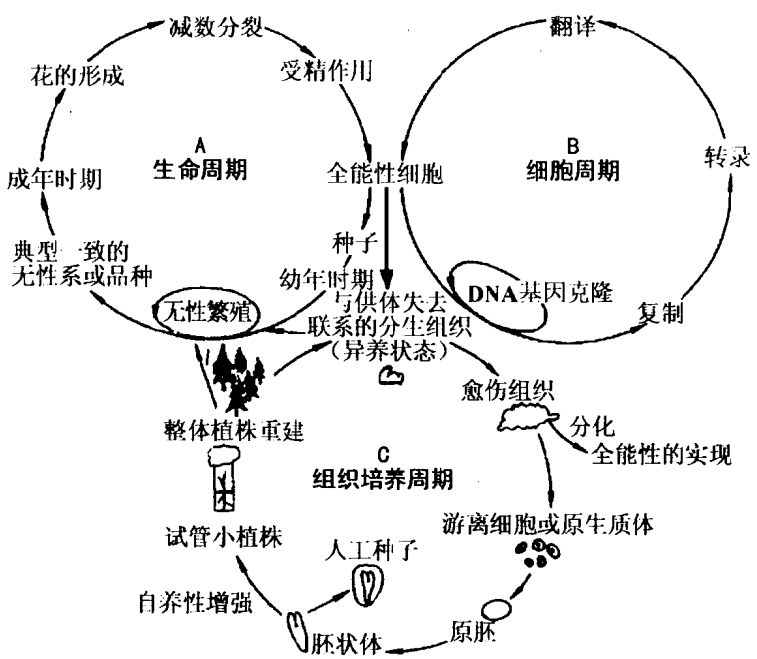
# 绪 论

## 一、植物细胞的全能性

组织培养是指植物的任何器官、组织或细胞，在人工预知的控制条件下，于含有营养物质和植物生长调节物质等组成的培养基中，使其生长、分化形成完整植株的过程。组织培养的理论依据是植物细胞具有全能性。即植物体任何一个细胞都携带着一套发育成完整植株的全部遗传信息，在离体培养情况下，这些信息可以表达，产生出完整植株。细胞全能性的实现可用图一表示。A 循环表示生命周期，它包括孢子体和配子体的世代交替。B 循环表示细胞的核质周期（细胞周期），由于核质互作，DNA 复制、转录 RNA 并翻译为蛋白质，使全能性形成和保持。C 循环是组织培养周期，组织或细胞与供体失去联系，处于无菌条件下，靠人工的营养及激素进行异养状态的代谢。这时的分生组织可通过 3 个途径实现细胞的全能性：一是由分生组织直接分生芽而达到快速繁殖的目的；二是由分生组织形成愈伤组织，经过分化实现细胞的全能性；三是游离细胞或原生质体形成胚状体，由胚状体直接重建完整植株，或制成人工种子后再重建植株。

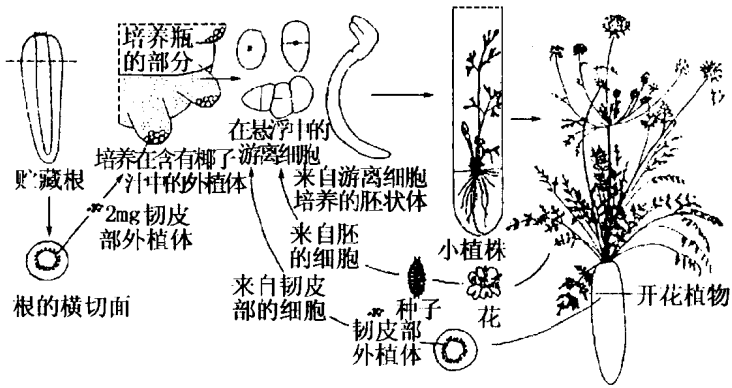
## 二、植物组织培养的历史

根据细胞学说，德国植物学家 Haberlandt 于 1902 年提出细胞全能性概念，认为离体培养的植物细胞具有通过胚胎发生过程而发育成完整植株的潜在能力。为了证实这一点，他用叶肉细胞、髓细胞等进行离体培养。由于取材及技术上的原因，并未获得成



图一 细胞全能性的实现

功。但他的观点却鼓舞后人，继续探索 and 追求。White 在 1939 年报道了由烟草种间杂种幼茎切段的形成层组织，进行了类似组织培养，获得成功并能继代培养，他提出植物细胞全能性学说。40 年代末 50 年代初，Skoog 和崔激等人进行烟草髓培养诱导根、芽器官，获得成功。1958 年美国 Steward 等和德国 Reinert 等分别由培养的胡萝卜根细胞诱导形成了胚状体，形成新植株。这一过程与胡萝卜的受精卵形成合子胚的发育极为相似。这就是用实验证明植物细胞的全能性（图二）。我国李继侗等曾作银杏离体胚培养，发现其胚乳提取物能促进离体胚生长。罗士韦是我国植物组织和细胞培养研究的开拓者和奠基人之一。在 30 年代即开创离体根培养，随着又进行幼胚和茎尖培养。解放后，特别在 70 年



图二 胡萝卜植株生长周期示意图

通过从韧皮部或胚得来的细胞把连续的生长周期连接起来

代以后，身体力行，指导植物组织培养技术的推广工作，取得了很大的成效。近二三十年，我国植物组织培养研究工作取得很大的成就，例如，从花药诱导出许多优良的水稻、小麦、烟草等品种，在花药培养和单倍体育种上，一直处于国际先进水平。又如，应用快速繁殖技术，繁殖出大量优良的甘蔗、香蕉、菠萝、杨树、桉树和花卉种苗，对农业、林业生产做出较大的贡献。

### 三、植物组织培养的应用

近三四十年来，由于组织培养基础理论研究的深入，发展更为迅速，实际应用范围也越来越广。

#### 1. 无性系快速繁殖

植物组织培养的快速繁殖，就是应用组织培养和细胞培养技术，快速繁衍珍稀濒危植物，使物种得以保存；以及快速繁殖名优特新品种，使其在一定时间内繁衍为一定数量的植株。快速繁殖的植株能保持母本的生物特性和遗传性状，并可在短期内种植于田间。快速繁殖是当前植物细胞工程中应用最广泛，又最有效

的方法之一。据 1990 年统计，我国快速繁殖的植物已达 443 种，已有 100 多个机构采用快速繁殖技术进行工厂化大规模商品生产，包括香蕉、甘蔗、桉树、花卉等。

## 2. 花药培养和花粉单倍体育种

离体花药—花粉培养的单倍体育种法，与常规方法相比，可以在短时间内得到作物的纯系，从而加快育种过程。我国科学家设计的  $N_6$  花药培养基和马铃薯培养基，不仅在国内得到推广，也被国外采用。到 1987 年为止，据不完全统计，我国各地用花药或花粉培育出的植物已有 22 科 52 属 160 个种，取得了较大的成就。已培育出小麦“花培 1 号”、“京花 1 号”，水稻“中花 1 号”等优良品种，并已大面积推广种植。

## 3. 药用植物的工厂化生产

当前各地采用组织培养来加速药用植物（如人参、紫草、贝母、三分三、甘草等）的繁殖生长已获得成功，并投入工厂化生产。我国植物种类繁多，草药的研究和利用具有悠久的历史，但过度采挖使某些药用植物资源遭到严重破坏，因此开展药用植物工厂化生产是很有必要的。

## 4. 种质的保存和基因库的建立

种质的保存和基因库的建立 在育种工作中是十分重要的。由于组织培养材料的体积小，利于在低温（如低温冰箱）或超低温（如液态氮）中长期保存。

## 5. 突变体的筛选培育

在细胞和组织培养进程中，基因型易发生变异，因此，人们采用紫外线、X 射线、 $\gamma$  射线对培养物照射，或者在培养基中加入叠氮化合物等，以诱导和提高突变频率，产生人们需要的突变体，供人们筛选培育。我国已筛选出耐盐的水稻、烟草、甘蔗的再生植株或细胞系，也筛选出比对照赖氨酸高 56.3% 的玉米胚性细胞团。

# 第一章 实验室设备和一般技术

植物组织培养是一项要求很高、技术性较强的工作。为了确保组织培养工作的成功，必须有最基本的实验设备条件，并熟练掌握一些与无菌操作有关的操作技术。

## 第一节 实验室设计和常用设备

### 一、实验室设计

植物组织培养的实验室，通常包括无菌操作室、配制培养基的准备室、培养材料用的恒温培养室、检查培养情况并做记录的细胞学实验室（图 1-1）。此外，工业化生产还需有相应的发酵设备及用于栽培试管苗的专用花房或遮荫棚等。实验室的大小和设置可根据自己的工作性质和规模自行设计，其中最主要的是无菌操作室和恒温培养室。

#### （一）无菌操作室

无菌操作室主要用于植物材料的消毒和接种，培养物的继代转移等等。它应是无尘、无对流空气的非常洁净的实验室。一般设内外两间，外间小些，为缓冲间；内间稍大，供接种用。无菌操作室内应安有紫外光灯，在操作前至少开灯 20 min。同时室内应定期用甲醛和高锰酸钾（每平方米空间需 2 ml 甲醛与过量的高锰酸钾）产生的蒸气熏蒸。但近年来多数实验室都采用超净工作台来代替无菌操作室。超净工作台不仅操作方便，且效果也很好。

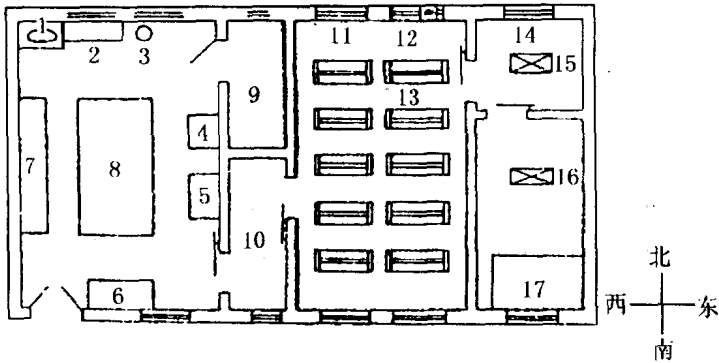


图 1-1 植物组织培养实验室的设置

1. 水池 2. 晾干架 3. 污物箱 4. 烘箱 5. 冰箱 6~8. 工作台
9. 天平室 (结合显微观察) 10. 缓冲室 11. 培养室 12. 空调
13. 培养架 14. 准备室 15~16. 紫外线灯 17. 接种台

在条件较差的情况下，可考虑自制无菌箱来代替无菌操作室或超净工作台。最简单的无菌箱可用木板或有机玻璃制成。假若用木板制作，上面可装配玻璃，以方便操作。左右两侧或在正面开两个圆孔，以便从圆孔口放入用具和培养基及进行操作。两个圆孔口内各安装上一个布制袖罩，避免灰尘和杂菌混入。箱内装有紫外灯，供灭菌用，同时装上日光灯供照明用（图 1-2）。

另外，无菌室还应有抽气泵供培养基（液）成分进行抽滤灭菌用。

## （二）准备室

主要用于植物组织培养所需器具的洗涤、干燥和保存，培养基的配制、分装和灭菌，化学试剂的存放及配制，重蒸馏水的生产，待培养植物材料的预处理及培养物的常规生理生化分析等操作。为了配制各种培养基，室内必须有一个较大的平面工作台及供放置各种培养器具的橱柜。



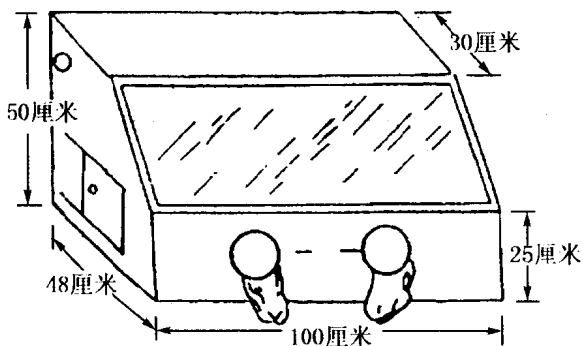


图 1-2 接种箱

### (三) 培养室

培养室主要用于满足外植体生长所需的温度、光照、湿度和气体等条件。室内主要应有培养架和控制温度和光照的设备。室内温度通常要求在  $25^{\circ}\text{C}$  左右，大都采用空调机来控制。培养室的光源通常采用普通的白色日光灯等。有时为了工作方便，可采用自动定时器控制光照时间，以免每天要人工开灯和关灯。有可能的话可考虑增设一个暗培养室，作为那些不需要光照的外植体培养的场合，如某些愈伤组织的诱导等。此外，培养室的湿度也是一个值得考虑的问题，特别是在冬季，室内装配有加温设备，空气干燥，湿度很低，容易造成试管或培养容器内培养基干涸。因此培养室内湿度应保持在  $70\% \sim 80\%$ 。在培养室内可放置液体培养需用的摇床或旋转床等。

除上述几种主要房间外，假若条件许可，也可以再建立摄影室以及供冲洗胶卷、印相和放大用的暗室，人工气候室及试管苗炼苗用的温室等等。